



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CFM- CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO**

**UTILIZAÇÃO DE UM MÉTODO ALTERNATIVO AO USO
DE PADRÕES PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS
GRAXOS TRANS**

Paulo César Lamin

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti
CO-ORIENTADOR: Luiz Martins Gonçalves Junior**

Florianópolis, agosto de 2006.

AGRADECIMENTOS

A Deus,

A minha família, Pai, Mãe, Irmãos, Tios e Avó pelo apoio durante meus estudos, por todo amor e carinho recebido, pelas palavras de incentivo e por aquela cervejinha. Obrigado!

A meus orientadores, Prof. Moacir Pizzolatti e Luiz Gonçalves pelo apoio dado durante a realização do trabalho.

Às companheiras de laboratório Mônica e Michelly, pelo carinho e amizade recebidos.

Ao pessoal da AQM, pela disponibilidade na realização de algumas análises.

Aos amigos de Jaraguá do Sul, que me receberam com muita hospitalidade durante os cinco meses de estágio.

Aos amigos Alexandre e Heros que me deram grande ajuda, fornecendo aqueles materiais de pesquisa.

A todos os outros grandes amigos formados em Florianópolis que sempre continuaram me acolhendo em minhas constantes idas à ilha em busca de conhecimento.

Ao Prof. Madureira, que me deu a oportunidade de galgar os primeiros passos no mundo da cromatografia.

Ao Prof. Ricardo que me ajudou no começo dessa caminhada, o meu obrigado.

Ao Cesar, minha banca e amigo, pelos momentos vividos juntos.

A Duas Rodas Industrial e a UFSC pelas oportunidades a mim concedidas.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMO	viii
1. A EMPRESA	01
1.1. Histórico	01
1.2. Unidades	02
1.2.1. Duas Rodas Matriz	02
1.2.2. Duas Rodas Nordeste	03
1.2.3. Duas Rodas Argentina	03
1.2.4. Duas Rodas Chile	03
1.3. Organização Hierárquica	03
1.4. Divisões	04
1.4.1. Divisão de Aromas	04
1.4.2. Divisão de Condimentos e Aditivos	04
1.4.3. Divisão de Produtos para Sorvete	05
1.4.4. Divisão Agroindustrial	05
1.4.5. Divisão de Soluções Integradas, Produtos e Serviços	05
2. INTRODUÇÃO	06
2.1. Lipídeos.....	06
2.1.1. Reações dos Ésteres	07
2.1.2. Ácidos Graxos	08
2.1.2.1. Nomenclatura	08
2.1.2.2. Ácidos Graxos Essenciais	09
2.1.2.3. Isomerismo	10
2.1.2.4. Ácidos Graxos trans	11
2.1.2.4.1. Ácidos Graxos trans e Doenças Coronárias	12
2.1.1.5. Ponto de Fusão	14
2.2. Hidrogenação.....	15
2.2.1. Conceitos Gerais	16
2.2.2. Seletividade	16
2.2.2.1. Mecanismo da Reação	17
2.2.2.2. Variáveis do Processo de Hidrogenação	18
2.3. Legislação	19

3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo Geral	21
3.2. Objetivos Específicos	21
4. METODOLOGIA	22
4.1. Reagentes	22
4.2. Equipamentos	22
4.3. Métodos Experimentais.....	22
4.3.1. Solução de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{H}_2\text{SO}_4$ em metanol	23
4.3.2. Extração dos Lípidos.....	23
4.3.3. Preparação dos Ésteres Metílicos	24
4.3.4. Condições Cromatográficas	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1. Derivatização das Amostras	25
5.2. Determinação do Perfil Lipídico	29
5.3. Efeito da Matriz	30
5.4. Quantificação das Amostras	32
5.5. Comparação entre Óleos e Gorduras	36
6. CONCLUSÃO	39
7. PERSPECTIVAS.....	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
ANEXO	43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Ácidos graxos saturados mais comuns	09
Tabela 2. Ácidos graxos insaturados mais comuns	09
Tabela 3. Efeito dos principais ácidos graxos	13
Tabela 4. Ponto de fusão de alguns ácidos graxos	14
Tabela 5. Caracterização dos picos cromatográficos	30
Tabela 6. Resultados da extração lipídica das amostras de chocolate em porcentagem de área	31
Tabela 7. Valores de porcentagem de área dos ésteres metílicos correspondentes aos ácidos graxos	32
Tabela 8. Resultados obtidos em gramas por 100 gramas para as amostras analisadas	35
Tabela 9. Comparação de resultados da amostra de chocolate	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica dos triacilgliceróis	09
Figura 2. Conversão de ésteres em ácidos carboxílicos	07
Figura 3. Reação de esterificação	07
Figura 4. Ácido oléico, um ácido graxo insaturado	08
Figura 5. Isomeria em ácidos graxos saturados	10
Figura 6. Isomeria geométrica em ácidos graxos insaturados	11
Figura 7. Estrutura dos ácidos esteárico, elaídico e oléico	12
Figura 8. Reação de hidrogenação	16
Figura 9. Reação com formação de HCl em metanol	26
Figura 10. Mecanismo de clivagem com íon hidróxido	27
Figura 11. Mecanismo da reação de esterificação de Fischer	28
Figura 12. Adsorção de uma dupla ligação aos átomos do catalisador	37

LISTA DE ABREVIATURAS

Siglas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOCS – American Oil Chemists Society

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

Abreviaturas

LDL – lipoproteína de baixa densidade

HDL – lipoproteína de alta densidade

Nº – número

CG/MS – cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas

FID – detector por ionização em chama

FAME – éster metílico de ácido graxo

$\Sigma\%$ Sat – somatório percentual de ácidos graxos saturados

$\Sigma\%$ Mono – somatório percentual de ácidos graxos monoinsaturados

$\Sigma\%$ Poli – somatório percentual de ácidos graxos poliinsaturados

$\Sigma\%$ Trans – somatório percentual de ácidos graxos trans

G.Total – gordura total

Sat – gorduras saturadas

Mono – gorduras monoinsaturadas

Poli – gorduras poliinsaturadas

Trans – gorduras trans

TR – tempo de retenção

RESUMO

Os ácidos graxos *trans* são gorduras formadas pelo processamento industrial dos alimentos ou pela hidrogenação natural que ocorre no rúmen dos animais. O consumo excessivo de alimentos ricos em gorduras *trans* pode causar aumento do colesterol total e do colesterol (LDL) e redução dos teores do colesterol (HDL).

Tendo consciência dos riscos que essas substâncias podem trazer a saúde, a ANVISA publicou a resolução RDC nº 360, a qual estabelece que a partir de 31 de julho de 2006 será obrigatória a presença do teor de ácidos graxos *trans* no rótulo dos produtos alimentícios. Para isso, são necessárias análises que segundo a metodologia oficial, requerem a utilização de técnicas cromatográficas e de padrões certificados.

Contudo, nem sempre há a disponibilidade de padrões para a realização destas análises. Pensando nisso, foi empregado, no presente trabalho, um método alternativo que utiliza espectrometria de massas acoplada a um cromatógrafo para a identificação dos componentes e um cálculo de porcentagem de área relativa aos cromatogramas obtidos para cada amostra.

Foram analisadas seis amostras, entre elas compreendidas dois óleos, duas gorduras hidrogenadas e duas amostras de chocolate, sendo possível a determinação do perfil lipídico das amostras, bem como a quantificação relativa e absoluta das mesmas.

Os resultados relativos mostraram-se coerentes, ficando dentro do limite de aceitação da AOAC, que é de 3%, sendo que finalmente foi feita uma comparação entre óleos e gorduras hidrogenadas, baseado nos resultados obtidos experimentalmente.

1. A EMPRESA

A Duas Rodas Industrial Ltda é uma empresa genuinamente brasileira na produção de aromas e aditivos para a indústria de alimentos. No Brasil, é a maior fabricante de aromas para a indústria de alimentos e a maior fornecedora de matérias-primas (mix de produtos) para a produção de sorvetes, com participação de 70% no mercado, sendo ainda a segunda produtora mundial de purê de banana.

Com capital 100% nacional, a empresa tem sua matriz localizada na cidade de Jaraguá do Sul, Santa Catarina, possuindo um parque fabril com mais de 45.000m² contando com cerca de 1200 colaboradores e um faturamento aproximado de R\$ 300 milhões por ano.

Com incentivo a pesquisa e desenvolvimento e contando com tecnologia de ponta, hoje a Duas Rodas Industrial Ltda apresenta cinco divisões, sendo elas: aromas, produtos para sorvete, condimentos e aditivos, agroindustrial e soluções integradas, exportando produtos para mais de 30 países da América Latina, América do Norte, Europa, África e Ásia. Para atender a esse vasto mercado, a empresa conta ainda com filiais no nordeste, Argentina e Chile.

1.1. Histórico

A Duas Rodas foi fundada pelo alemão, químico e farmacêutico, Rudolph Hufenüssler e sua esposa Hildegard, formada em física, que migraram para o Brasil no final da 1ª Guerra Mundial com o objetivo de realizar um antigo projeto de produzir extratos e essências naturais.¹

Rudolph e Hildegard partiram de Mainz, na Alemanha, cujo brasão é um desenho de duas rodas (simbolizando as embarcações movidas a vapor, que navegavam na confluência dos rios Reno e Meno) ligadas por uma cruz, em referência ao Arcebispo de Mainz. Da ilustração do brasão foram retirados o nome e marca da empresa que, em 1925 começou a produzir óleos essenciais em Jaraguá do Sul – SC, então com o nome de Indústrias Reunidas Jaraguá S.A.¹

Banhada pelo rio Itapocu e cortada pela ferrovia que ligava o Rio Grande do Sul a São Paulo, Jaraguá do Sul se tornou o destino do jovem casal de

imigrantes, que após adquirirem um terreno de cinco hectares, construíram uma casa, iniciando sua indústria de fundo de quintal.²

Com grande conhecimento científico e com a idéia fixa de produzir aromas, Rudolph importou os primeiros equipamentos da Alemanha e plantou as primeiras mudas de hortelã-pimenta, tendo como trunfo para convencer os clientes, a qualidade dos produtos oferecidos, sendo comparáveis aos padrões europeus.³

Intensas pesquisas seriam ainda necessárias para a manutenção dessa qualidade e para a oferta de novos produtos ao mercado brasileiro, sendo a empresa pioneira na fabricação de aromas e óleos essenciais no Brasil, tendo ainda em 1938 iniciado as exportações de óleos cítricos e suco de laranja pasteurizado. Em 1965 o purê de banana Bananex foi lançado como segunda marca existente no mercado mundial.¹

A primeira mudança administrativa da empresa ocorreu em 1955, com a morte de Rudolph, cabendo a Hildegard a responsabilidade de assumir a empresa, juntamente com seus filhos Dietrich, na direção técnica e Rodolfo, na administrativa.¹ Hoje, após uma nova reestruturação administrativa e empresa conta ainda com Leonardo e Monika, netos de Rudolph.

Assim surgiu a Duas Rodas Industrial, sempre voltada para o futuro, investindo em tecnologia e pesquisa, tornando-se a maior fabricante de matérias-primas para a indústria de alimentos da América Latina.¹

1.2. Unidades

Para atender ao mercado com maior eficiência, desenvolvendo produtos de acordo com as preferências regionais, a Duas Rodas Industrial conta com as seguintes unidades, estrategicamente localizadas:³

1.2.1. Duas Rodas Matriz

O parque industrial conta com cerca de 45.000m² de área construída, localizados na Rua Rodolfo Rufenüssler 755, Jaraguá do Sul, Santa Catarina possuindo ainda 1.500 hectares de fazendas, que produzem matéria-prima para abastecer parte das necessidades da indústria. Dispõe de

aproximadamente 1.200 colaboradores que são responsáveis pela produção de mais de 10.000 itens diferentes.¹

1.2.2. Duas Rodas Nordeste

Localizada na cidade de Estância (SE) tem 6.000m² de área construída e cerca de 100 colaboradores, a filial tem como objetivo facilitar a logística das regiões Norte e Nordeste. Produzindo inicialmente diversos itens da divisão de produtos para sorvete, a mesma vem para reforçar o objetivo da empresa, de garantir a satisfação dos clientes.³

1.2.3. Duas Rodas Argentina

Existente desde 1997, encontra-se localizada em Buenos Aires e produz diversos itens das divisões de produtos para sorvete e aromas, além de corantes em geral destinados a indústria de alimentos. Além disso, desenvolve trabalhos específicos para cada cliente.³

1.2.4. Duas Rodas Chile

A filial, adquirida em 1996, possui uma unidade fabril de 2.900m², responsável pelo abastecimento de toda a costa do Oceano Pacífico. Sendo a primeira unidade produtiva fora do Brasil, teve como objetivo criar um centro de excelência que atendesse não só ao mercado chileno, como de toda a região.³

1.3. Organização Hierárquica

A empresa está dividida em quatro grandes áreas: comercial, industrial, pesquisa e desenvolvimento e administrativa, sendo resumidamente exposto a seguir:³

- Comercial: departamento de marketing, logística, vendas de aromas, sorvetes, condimentos e aditivos;
- Industrial: departamento de produção, que compreende o setor de fibras/embalagens, essências, sorvetina, bases para chicletes,

condimentos, purê de banana, copinhos, destilaria, coberturas, spray/aromas e agroindustrial, bem como o departamento de manutenção;

- Pesquisa e desenvolvimento: departamento de desenvolvimento de aromas, aplicação de produtos, pesquisa e análises;
- Administrativa: departamento de recursos humanos, administrativo/financeiro, garantia da qualidade e sistema de informações.

1.4. Divisões

1.4.1. Divisão de Aromas

Importante fornecedor do segmento, a Duas Rodas se destaca por desenvolver aromas com auxílio da mais moderna tecnologia e de uma equipe especializada de flavoristas. Profissionais treinados prestam assistência técnica para aplicação de produtos na própria empresa ou na empresa do cliente. Formulações e aplicações fazem parte deste mix de serviços. Apresenta as linhas de produtos de aromas em pó e líquidos (naturais e artificiais), emulsões, extratos naturais e óleos essenciais.³

1.4.2. Divisão de Condimentos e Aditivos

Desenvolvidos para a indústria da carne, desde as tradicionais até as exóticas, são utilizados na fabricação de presuntos, salsichas, marinados, molhos, mortadelas e muitos outros produtos que recebem sabor, textura, estabilidade e ampliação da conservação no frigorífico piloto da Duas Rodas. Tem como produtos condimentos em pó, aromas líquidos naturais, aroma natural de fumaça, curas, fixadores de cor, estabilizantes, emulsificantes, antioxidantes e impermeabilizantes.³

1.4.3. Divisão de Produtos para Sorvete

Líder no mercado de ingredientes para sorvetes no Brasil, a Duas Rodas desenvolveu os produtos das marcas Selecta, Algemix, Emustab, Topping e Soya Ice, distribuídos em todo o Brasil e na América Latina, sempre mantendo o compromisso com a pesquisa e constante inovação tecnológica para o segmento. Presta assistência técnica permanente e treinamento para fabricantes iniciantes, além de especialização para empresas que já atuam no mercado. Também fornece esclarecimentos sobre o uso de produtos e receitas para fabricação de sorvetes. Apresenta as linhas de produção de coberturas para taças e gelados, copos de massa e biscoito, sabores concentrados, estabilizantes, emulsificantes e base para sorvete.³

1.4.4. Divisão Agroindustrial

Atenta às necessidades do mercado mundial, que exige atenção especial para alimentos saudáveis, a Duas Rodas desenvolve produtos com qualidade e tecnologia voltados especialmente para este segmento, com um completo *mix* de flocos de frutas, inclusive biológicos, desidratados de carnes e vegetais, *blends* de sucos, extrato de malte, purê de banana e demais produtos da marca Bananex. Apresenta ao mercado suas linhas de flocos de frutas, suco de cebola, desidratados, base para goma de mascar, extrato de malte e produtos Bananex (purê de banana, banana fatiada congelada, banana em flocos e em pó).³

1.4.5. Divisão de Soluções Integradas, Produtos e Serviços

Um serviço personalizado em que aromas, condimentos e aditivos Duas Rodas já estão incorporados e misturados a outras matérias-primas relativas ao produto final. Tem como diferencial desenvolver produtos sob medida para a indústria de alimentos. A divisão encontra soluções tecnológicas adequadas ao processo de produção de cada cliente, fornecendo concentrados especiais para bebidas energéticas e isotônicos, temperos, molhos prontos, preparados para iogurte e mixes pó e concentrados.³

2. INTRODUÇÃO

2.1. Lipídeos

Os lipídeos correspondem a um conjunto de substâncias químicas que, ao contrário das outras classes de compostos orgânicos, não são caracterizadas por grupo funcional em comum, mas sim pela sua alta solubilidade em solventes orgânicos e baixa solubilidade em água. Os lipídeos se encontram distribuídos em todos os tecidos, principalmente nas membranas celulares e nas células de gordura.⁴

Constituem uma das principais fontes de energia utilizada pelo homem, fornecendo de duas a três vezes mais calorias que os carboidratos e proteínas. Além disso alguns lipídeos apresentam funções biológicas, sendo responsáveis pelo transporte e armazenamento de combustível metabólico, dentre outras.⁵

Existem diversos tipos de moléculas diferentes, que apesar de não apresentarem nenhuma característica estrutural em comum, pertencem à classe dos lipídeos. Os esteróides, terpenos, prostaglandinas, fosfolipídeos, óleos e gorduras estão entre os principais constituintes dos lipídeos.⁴

Os óleos e gorduras são os lipídeos mais comuns. São constituídos principalmente por triacilgliceróis, que são triésteres de glicerol contendo três ácidos graxos (ácidos monocarboxílicos alifáticos). Na **Figura 1**, é apresentada a estrutura básica dos triacilgliceróis, onde os grupos R_1 , R_2 e R_3 são cadeias alquílicas que podem conter de 3 a 25 átomos de carbono.⁶

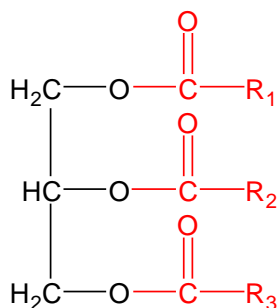


Figura 1. Estrutura básica dos triacilgliceróis.

A diferença básica entre óleos e gorduras ocorre devido à presença de duplas ligações carbono-carbono na estrutura dos grupos R, conferindo aos óleos um estado líquido à temperatura ambiente, enquanto que as gorduras apresentam consistência sólida devido à presença de cadeias saturadas em sua estrutura triglicerídica.⁶

2.1.1. Reações dos Ésteres

Como visto no item 2.1., os ésteres são os maiores constituintes dos triacilgliceróis. Sendo assim, é importante se destacar duas reações básicas, que ocorrem com os ésteres ou que os originam.

a) *Conversão a ácidos carboxílicos* – conforme mostrado na **Figura 2**, os ésteres podem ser clivados pelo íon hidróxido em metanol para dar origem a ácidos carboxílicos e álcoois. No caso dos triacilgliceróis, irão ser formados três moléculas de ácidos graxos e uma de glicerol.⁴

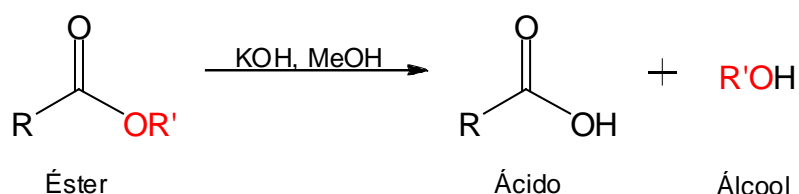


Figura 2. Conversão de ésteres em ácidos carboxílicos.

b) *Esterificação de Fischer* – ésteres podem ser sintetizados pela reação entre um ácido carboxílico e um álcool em meio ácido, que é uma reação de substituição nucleofílica no radical acil. Esta reação está esquematicamente demonstrada na **Figura 3**.⁴

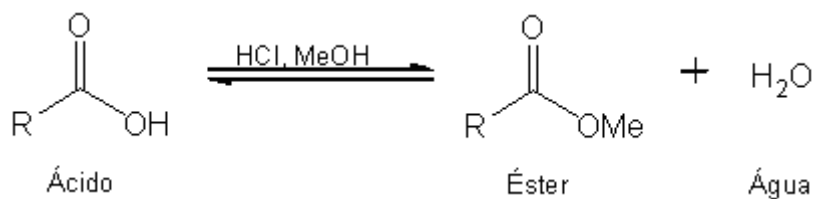


Figura 3. Reação de esterificação.

2.1.2. Ácidos Graxos

Os ácidos graxos ocorrem na natureza como substâncias livres ou esterificadas. A maior parte encontra-se esterificada com o glicerol, formando os triacilgliceróis. Apresentam uma estrutura hidrocarbonada linear, com um grupo carboxílico terminal. Em sua maioria, apresentam números pares de carbono, sendo os mais abundantes os com 16 e 18 átomos de carbono. Podem ser saturados, monoinsaturados ou poliinsaturados. Na **Figura 4** é apresentado um exemplo de ácido graxo, o ácido oléico, que apresenta uma insaturação no carbono 9.⁶

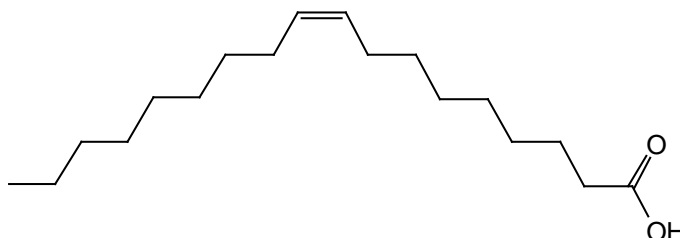


Figura 4. Ácido oléico, um ácido graxo insaturado.

2.1.2.1. Nomenclatura

Existem três maneiras de se nomear um ácido graxo:⁶

- usando um nome comum, de sua origem ou fonte principal, como por exemplo o ácido **linoléico**, de *linum* (linho) e o ácido **araquidônico**, de *arachné* (teia de aranha);
- através da nomenclatura sistemática onde seguem-se as recomendações da IUPAC, utilizando a terminação *óico* para os ácidos graxos saturados e *enóico* para os insaturados;
- utilizando uma nomenclatura mais atual, onde indica-se primeiro o comprimento da cadeia de carbonos, seguido do número de duplas ligações e pela posição da primeira dupla ligação a partir da extremidade metílica (CH_3) ou carbono Ω , podendo ainda este último fator ser substituído pelas posições das duplas ligações, identificando a forma isomérica *cis* ou *trans*.

São apresentados na **Tabela 1** e **2**, alguns dos principais ácidos graxos saturados e insaturados presentes na natureza:

Tabela 1. Ácidos graxos saturados mais comuns.

Nome comum	Nome sistemático	Nº de Carbonos	Designação
Butírico	Butanóico	4	C4:0
Capróico	Hexanóico	6	C6:0
Caprílico	Octanóico	8	C8:0
Cáprico	Decanóico	10	C10:0
Láurico	Dodecanóico	12	C12:0
Mirístico	Tetradecanóico	14	C14:0
Palmítico	Hexadecanóico	16	C16:0
Esteárico	Octadecanóico	18	C18:0
Araquídico	Ecosanóico	20	C20:0

Fonte: NUNES (1998).⁷

Tabela 2. Ácidos graxos insaturados mais comuns.

Nome comum	Nome sistemático	Designação
Palmitoléico	9-cis-Hexadecenóico	16:1 Ω -7 ou 16:1 9c
Oléico	9-cis-Octadecenóico	18:1 Ω -9 ou 18:1 9c
Linoléico	9,12-cis,cis-Octadecadienóico	18:2 Ω -6 ou 18:2 9c12c
Linolênico	9,12,15-ccc-Octadecatrienóico	18:3 Ω -3 ou 18:3 9c12c15c

Fonte: NUNES (1998).⁷

2.1.2.2. Ácidos Graxos Essenciais

O organismo humano é capaz de biosintetizar quase todos os tipos de ácidos graxos que necessita. Contudo existem ácidos não sintetizados pelo organismo, denominados ácidos graxos essenciais. São ácidos poliinsaturados que devem ser adquiridos através da alimentação. Popularmente conhecidos por Ômega-3 (ácido linolênico), Ômega-6 (ácido linoléico), Ômega 7 (ácido palmitoléico) e Ômega 9 (ácido oléico), estes ácidos são responsáveis pela constituição e manutenção das membranas celulares, regularizando diversas

disfunções de nosso organismo, restabelecendo o equilíbrio e bem estar no dia-a-dia.⁶

2.1.2.3. Isomerismo

Os ácidos graxos naturais existem em formas isoméricas específicas. Os isômeros químicos são compostos que ocorrem em duas ou mais formas, apesar de possuírem mesmo número de átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio. Ácidos graxos saturados terão como isômeros apenas os ácidos com ramificação da cadeia, como os ácidos valérico e isovalérico, representados na **Figura 5**.⁸

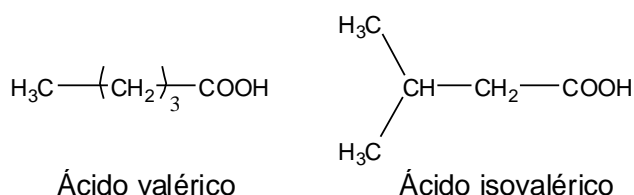


Figura 5. Isomeria em ácidos graxos saturados.

Para ácidos graxos insaturados podem existir ainda, mais dois tipos de isomeria: uma de posição e outra geométrica. No primeiro caso, podem existir isômeros posicionais em relação à localização da dupla ligação na cadeia de carbono. Na natureza essas duplas ligações estão com frequência localizadas nos carbonos 9, 12 e 15. Na isomeria geométrica as duplas ligações impedem a livre rotação dos átomos de carbono, ocorrendo dois segmentos na cadeia hidrocarbonada, que podem se encontrar do mesmo lado, como no isômero cis ou em lados opostos, gerando a configuração do isômero trans. Os isômeros geométricos cis e trans de um ácido graxo monoinsaturado são representados na **Figura 6**. Os ácidos graxos com mais de uma insaturação podem existir em mais de duas configurações, dessa maneira, o ácido linoléico, com duas insaturações, ambas cis, terá como isômeros as configurações cis-trans, trans-cis e trans-trans.⁵

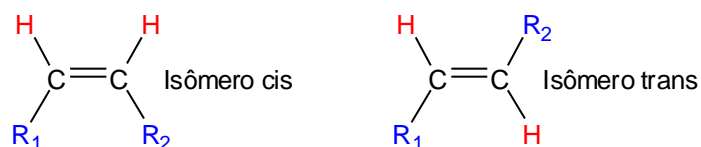


Figura 6. Isomeria geométrica em ácidos graxos insaturados.

Os ácidos graxos naturais são encontrados com mais frequência na forma cis. Em óleos e gorduras de origem vegetal os isômeros trans estão ausentes, sendo os mesmos geralmente formados em reações químicas como a hidrogenação e oxidação. Pode ainda ocorrer isomerização da forma cis para a trans quando os primeiros são submetidos a altas temperaturas.⁸

2.1.2.4. Ácidos Graxos trans

São provenientes da isomerização dos ácidos graxos insaturados, com geometria cis, uma vez que não são encontrados naturalmente.⁹

Os ácidos graxos trans apresentam pelo menos uma dupla ligação na configuração trans. Podem ser encontrados no leite, carne e gordura de mamíferos ruminantes, resultantes da biohidrogenação de ácidos graxos poliinsaturados por bactérias do rúmen.¹⁰ Entretanto, as gorduras parcialmente hidrogenadas são as maiores fontes destes ácidos, sendo encontradas em um grande número de alimentos processados como margarinas e produtos de panificação.⁹

Apresentam uma configuração molecular mais linear conferindo maior similaridade de estrutura com a dos ácidos graxos saturados do que com os isômeros insaturados na forma cis. **A Figura 7** mostra a estrutura dos ácidos esteárico, oléico e elaídico, indicando as semelhanças e diferenças estruturais.¹¹

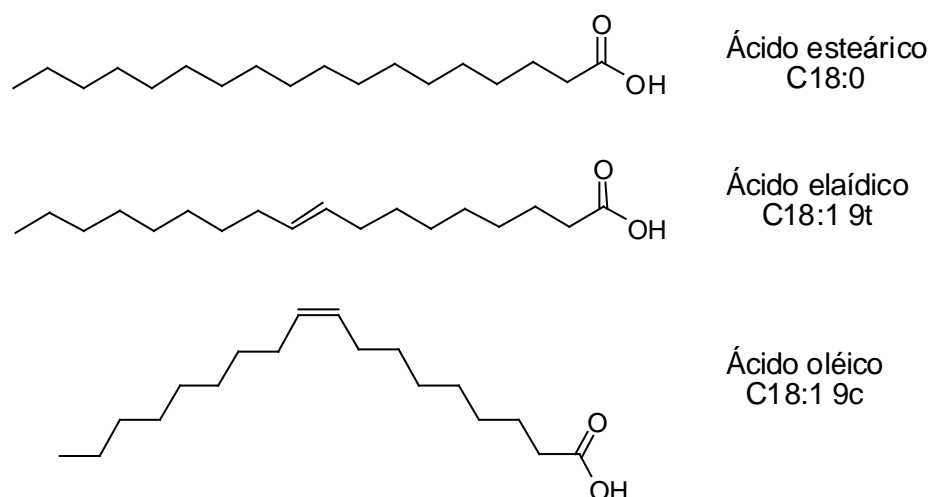


Figura 7. Estrutura dos ácidos esteárico, eláídico e oléico.

Diversos estudos têm sido realizados tanto em animais como em seres humanos, demonstrando os malefícios causados por uma dieta rica em ácidos graxos trans, relacionando esses compostos com várias disfunções metabólicas, como por exemplo a inibição do metabolismo de ácidos graxos essenciais influenciando o desenvolvimento infantil.¹² Entretanto, o principal efeito à saúde está relacionado ao aumento do risco das doenças cardiovasculares.¹¹ Sabe-se que existe uma relação íntima entre o consumo de ácidos graxos saturados e o aumento dos níveis de colesterol. A concentração de colesterol sanguíneo tende a aumentar duas vezes quando o consumo de ácidos graxos saturados é maior que o de ácidos poliinsaturados. Já os ácidos graxos insaturados têm um efeito hipocolesterolêmico.¹⁰

2.1.2.4.1. Ácidos Graxos trans e Doenças Coronárias

Os ácidos graxos trans têm semelhanças nas suas propriedades físicas com os ácidos graxos saturados, mas apresentam efeitos biológicos diferentes.¹⁰

Por sua natureza hidrofóbica necessitam de lipoproteínas para tornar possível o seu transporte através dos fluidos e tecidos dos organismos. As lipoproteínas nada mais são do que agregados supramoleculares formados por triacilgliceróis, ésteres do colesterol, fosfolipídios e apoproteínas. As partículas

de lipoproteínas variam em tamanho indo desde os quilomícrons até as chamadas LDL (lipoproteínas de baixa densidade) e HDL (lipoproteínas de alta densidade).⁶ A gordura da dieta é absorvida sob a forma de ácidos graxos e monoacilglicerídeos, estes são reesterificados a triacilgliceróis nos enterócitos, os quais são levados até os tecidos periféricos pelos quilimícrons. Durante a passagem dos quilomícrons remanescentes pelo plasma, são formadas as LDL, que levarão o colesterol para os tecidos periféricos. Este processo ocorre através dos receptores de LDL. Quando a concentração destes receptores está diminuída, a LDL se acumula no plasma; aumentando assim, o risco de ocorrência de doença cardíaca coronariana. O colesterol e ácidos graxos saturados causam o aumento da LDL porque diminuem a atividade do receptor que é sensível à ação direta de alguns nutrientes específicos ou ainda de efeitos genéticos.¹³

O colesterol é considerado o maior intermediário entre as gorduras da dieta e as doenças cardíacas coronarianas. O efeito hipercolesterolemizante dos ácidos graxos trans em relação aos seus correspondentes cis, é que eleva a concentração de LDL num grau semelhante aos ácidos graxos saturados. Por outro lado, diferentemente das outras gorduras, os isômeros trans diminuem também as concentrações de HDL, que atua na remoção do excesso de colesterol dos tecidos periféricos, levando-o para o fígado para ser excretado.¹⁰

Na **Tabela 3** é apresentado de forma sucinta o efeito provocado pelos diversos tipos de ácidos graxos sobre as lipoproteínas:

Tabela 3. Efeito dos principais ácidos graxos sobre as lipoproteínas.

Ácido Graxo	LDL	HDL
Saturados	Aumenta	Não influencia
Monoinsaturados	Diminui	Aumenta
Poliinsaturados	Diminui	Diminui
Trans	Aumenta	Diminui

2.1.2.5. Ponto de Fusão

O ponto de fusão dos ácidos graxos está diretamente relacionado:¹⁴

- a) ao número de átomos de carbono – ácidos graxos com cadeias de menor número de átomos de carbono têm menor ponto de fusão;
- b) ao número de ligações insaturadas – a existência de insaturações também diminui o ponto de fusão dos ácidos graxos, comparativamente aos ácidos contendo o mesmo número de átomos de carbono. À medida que aumenta o número de insaturações, observa-se uma diminuição do ponto de fusão;
- c) à existência de ligações trans - o ponto de fusão dos ácidos graxos com ligações trans é mais alto que o dos isômeros com ligações cis. Desse modo, os pontos de fusão dos ácidos elaídico e linolelaídico, são maiores que os pontos de fusão dos ácidos oléico e linoléico, seus isômeros cis, respectivamente.

Para os triacilgliceróis a influência dos ácidos graxos neles presente é importante, contudo a distribuição destes nos triacilgliceróis também irá influenciar no ponto de fusão.¹⁴

Na **Tabela 4**, é apresentado o ponto de fusão de diversos ácidos graxos.

Tabela 4. Ponto de fusão de alguns ácidos graxos.

Ácido	Designação	Ponto de Fusão (°C)
Butírico	C4:0	- 4
Capróico	C6:0	- 3,5
Caprílico	C8:0	17
Cáprico	C10:0	31
Láurico	C12:0	48
Mirístico	C14:0	58
Palmítico	C16:0	64
Esteárico	C18:0	69
Araquídico	C20:0	75
Petroselínico	C18:1(6c)	29
Petroselaídico	C18:1 (6t)	54
Oléico	C18:1 (9c)	16

Tabela 4. Continuação.

Ácido	Designação	Ponto de Fusão (°C)
Elaídico	C18:1 (9t)	45
Cis-vacênico	C18:1 (11c)	15
Trans-vacênico	C18:1 (11t)	44
Gadoleico	C20:1 (9c)	34
Erúcico	C20:1 (9t)	33
Linoleico	C18:2 (9c, 12c)	- 5
Linolelaídico	C18:2 (9t, 12t)	28
α -linolênico	C18:3 (9c, 12c, 15c)	-11
	C18:3 (9t, 12t, 15t)	30

Fonte: (FORMO et al., 1979)¹⁵

2.2. Hidrogenação

A hidrogenação é um processo que transforma um óleo líquido em um semi-sólido, o qual é chamado de gordura. Quanto mais hidrogenado for o óleo, mais sólido ele será na temperatura ambiente, portanto, mais saturado. De um modo geral, as gorduras saturadas são encontradas principalmente em alimentos de origem animal, enquanto as gorduras cremosas ou líquidas (mono e poliinsaturadas) são mais abundantes em determinados vegetais. Portanto o grau de saturação pode ser facilmente identificado nos três tipos de gordura através da sua dureza em temperatura ambiente. As saturadas são sólidas; as gorduras mono-insaturadas são cremosas, porém se solidificam se colocadas no refrigerador. Já as gorduras poli-insaturadas são líquidas, não se solidificam nem mesmo quando colocadas no congelador.¹⁶

A hidrogenação, inicialmente desenvolvida por SABATIER em 1897, e patenteada por NORMAN em 1903, é atualmente o processo de modificação de consistência mais usado na indústria de óleos e gorduras.⁸

2.2.1. Conceitos Gerais

Uma reação de hidrogenação, apresentada na **Figura 8**, de uma dupla ligação carbono-carbono a princípio pode parecer bastante simples, porém trata-se de uma reação bastante complexa.¹⁶

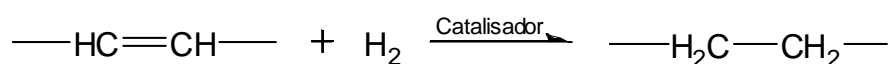


Figura 8. Reação de hidrogenação

Para que a hidrogenação ocorra, três substâncias devem estar presentes: um óleo insaturado (líquido), o gás hidrogênio e um catalisador sólido. Esse sistema trifásico deve ser adicionado a um reator aquecido sob pressão. O hidrogênio gasoso deve ser dissolvido na fase líquida antes que a reação tenha início. O hidrogênio deve então se difundir através do líquido até a superfície sólida do catalisador. Ao menos um dos reagentes deve sofrer adsorção química na superfície do catalisador.¹⁶

Existem duas razões básicas para que se utilize o processo de hidrogenação em um óleo: aumentar a consistência desse óleo, tornando-o mais sólido ou aumentar a estabilidade oxidativa de forma a manter o produto em condições organolépticas aceitáveis e mantê-lo em condições de uso por longos períodos de tempo.¹⁷

2.2.2. Seletividade

A seletividade indica qual composto irá reagir preferencialmente, de acordo com o grau de insaturação encontrado no ácido graxo, bem como a capacidade de manutenção da preferência até que a concentração da referida substância insaturada diminua, ou seja, procura-se a redução preferencial dos ácidos graxos mais insaturados. Em reações de hidrogenação a seletividade da mesma está relacionada com a quantidade de hidrogênio presente na superfície do catalisador.¹⁶

2.2.2.1. Mecanismo da Reação

Sabe-se que as reações de hidrogenação e de isomerização podem ocorrer simultaneamente na superfície do catalisador, onde uma nova ligação carbono-hidrogênio é formada.⁸ Nesse processo tanto as moléculas de hidrogênio quanto às de alcenos são adsorvidas na superfície do catalisador sendo a transferência dos átomos de hidrogênio realizada em etapas para a mesma face do alceno (isômero cis) ou para faces opostas (isômero trans), podendo ainda ocorrer outras reações durante o processo.¹⁸

Uma superfície de catalisador altamente revestida por átomos de hidrogênio favorece a probabilidade de um par de átomos de hidrogênio estar na posição geometricamente correta para a reação com um grupo etênico de um radical de ácido graxo insaturado. Assim, quando a concentração de hidrogênio for alta, a primeira dupla ligação de um sistema poliinsaturado a ser adsorvida no catalisador, deve com frequência ser completamente hidrogenada antes que outros possam estabelecer ligações com a superfície, sendo a molécula dessorvida rapidamente. Esse fato indica que as chances de um grupo mono ou poliinsaturado serem hidrogenadas são aproximadamente iguais. A seletividade então será baixa, assim como a isomerização geométrica, tendendo a haver a formação de uma grande quantidade de ácidos graxos saturados.¹⁶

Quando a superfície do catalisador está parcialmente revestida com átomos de hidrogênio, esses serão mais fortemente presos ao catalisador do que quando ela está muito revestida com hidrogênio. Nessas condições, a probabilidade de que dois átomos de hidrogênio estejam em posições favoráveis para reagir com um grupo etênico será menor. Com isso o limitado suprimento de hidrogênio iria para as moléculas mais reativas, que no caso são as poliinsaturadas. Uma baixa concentração de hidrogênio na superfície do catalisador conduz a períodos relativamente longos de adsorção e dessorção das moléculas insaturadas antes que elas reajam, havendo um aumento na oportunidade de os radicais mais reativos deslocarem os que são menos reativos e menos adsorvidos. Nesse caso, a seletividade e a isomerização serão altas.¹⁶

2.2.2.2. Variáveis do Processo de Hidrogenação

As variáveis que podem afetar a concentração de hidrogênio e os resultados da hidrogenação são: temperatura, pressão de hidrogênio no reator, intensidade de agitação, quantidade de catalisador, tipo de catalisador.¹⁷

Temperatura –Um aumento na temperatura reduz a solubilidade do gás hidrogênio no óleo líquido e conseqüentemente na superfície do catalisador. Um aumento na temperatura aumenta a seletividade, a formação de isômeros e a velocidade da reação;¹⁷

Pressão de hidrogênio– A baixas pressões, o gás hidrogênio dissolvido no óleo não recobre toda a superfície do catalisador, enquanto, a altas pressões, o hidrogênio está prontamente disponível para a saturação das ligações duplas. Um acréscimo na taxa de saturação resulta em um decréscimo na formação de trans e na seletividade produzindo uma curva de sólidos plana;¹⁷

Intensidade de agitação – a principal função da agitação é fornecer hidrogênio dissolvido para a superfície do catalisador, bem como agitar a massa reacional e manter o catalisador em suspensão. A seletividade e a isomerização serão reduzidas desde que o catalisador seja suprido com suficiente hidrogênio para aumentar a velocidade de reação;¹⁷

Quantidade de catalisador – a velocidade de reação aumenta com o aumento da concentração de catalisador até um ponto em que se estabiliza. Tanto a seletividade quanto a formação de isômeros trans sofrem um acréscimo com o aumento da concentração de catalisador, porém um aumento suave;¹⁷

Tipo de catalisador – a escolha do catalisador tem uma forte influência na velocidade da reação, na seletividade e na isomerização geométrica. O catalisador mais utilizado na indústria de alimentos atualmente é o Níquel;¹⁷

Fonte do óleo – a seletividade da hidrogenação depende do tipo de ácido graxo insaturado e do número de ácidos graxos por triacilglicerol. Óleos com altos níveis de ácidos linolênico ou linoléico hidrogenam mais rapidamente do que óleos com altos níveis de ácido oléico.¹⁷

2.4. Legislação

O Código de Defesa do Consumidor brasileiro, no seu artigo 31, determina que os produtos ofertados à população devem apresentar declarações corretas e objetivas a respeito de suas características quanto à qualidade, quantidade, composição, entre outras, além dos riscos que oferecem à saúde dos consumidores. A informação precisa sobre o conteúdo dos nutrientes, entre eles, os ácidos graxos saturados e os ácidos graxos *trans* nos alimentos possibilita ao consumidor a escolha de uma alimentação mais saudável.¹⁹

Sabendo que diversos produtos alimentícios como biscoitos, margarinas, salgadinhos dentre outros são elaborados empregando como ingrediente gordura vegetal hidrogenada, rica em ácidos graxos *trans* e tendo conhecimento de que a ingestão dos mesmos ácidos graxos pode trazer riscos à saúde a ANVISA publicou a resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003 com o objetivo de facilitar ao consumidor o conhecimento das propriedades nutricionais dos alimentos por ele consumidos.²⁰

A RDC nº 360 fala em seu Art. 2º e 3º que na rotulagem nutricional dos alimentos devem ser declarados os seguintes nutrientes: valor energético, carboidratos, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras *trans* e sódio e que as empresas têm prazo até 31 de julho de 2006 para se adequarem à mesma.²⁰

O anexo da mesma resolução, em seu item 2.7.4. define gorduras *trans* como sendo triglicerídeos que contêm ácidos graxos insaturados com uma ou mais dupla ligação *trans*, expressos como ácidos graxos livres, ficando estabelecido pelo item 3.1.5. a obrigatoriedade de ser informado no rótulo dos alimentos a quantidade de gorduras *trans*.²⁰

Com relação ao valor mínimo estipulado, o item 3.4.3.2. do mesmo anexo informa que o valor nutricional será expresso como “zero” ou “não contém” quando o alimento contiver quantidades menores ou iguais as estabelecidas como “não significativas”, estando estabelecido que esse valor é de 0,2 g por cem gramas para gorduras *trans*. Fica ainda estabelecido segundo o item 3.4.4.1. que não deverá ser informada a porcentagem diária de ingestão recomendada para gorduras *trans*.²⁰

Quanto à tolerância relativa ao valor informado no rótulo pelo fabricante, os itens 3.5.1. e 3.5.2. estabelecem um limite de aceitação de até 20% em relação ao informado, sendo que qualquer valor acima disso deve ser relatado pela empresa, que deve apresentar estudos que justifiquem tal variação.²⁰

Paralelamente, existe a Portaria nº 27/98, da ANVIS A/MS, que é válida enquanto a RDC nº 360 não entra em vigor, que determina que os ácidos graxos *trans* devem ser computados no cálculo de gorduras saturadas (quando aplicável). Porém, esta Portaria é de caráter opcional, ficando a critério das empresas a declaração ou não desta informação.²¹

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Empregar um método alternativo ao uso de padrões, para a determinação de ácidos graxos trans em amostras de gordura por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

3.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar a necessidade de uma extração lipídica preliminar a preparação dos ésteres metílicos nas amostras com matrizes complexas;
2. Determinar o perfil lipídico das amostras analisadas;
3. Fazer a quantificação das amostras através dos valores de porcentagem de área dos picos cromatográficos e do teor de gorduras totais das mesmas.

4. METODOLOGIA

4.1. Reagentes

Para o desenvolvimento do trabalho, foram utilizados os seguintes reagentes:

- Merck: clorofórmio, ácido sulfúrico, cloreto de amônio, hidróxido de potássio e sulfato de sódio, todos com grau P.A.;
- J. T. Baker: cloreto de sódio P.A.;
- Carlos Erba: metanol grau HPLC;
- Burdick & Jackson: heptano grau HPLC.

4.2. Equipamentos

Para a realização do presente trabalho foi utilizado um cromatógrafo HP 6890 Series acoplado com detector seletivo de massas HP 6890 Series e computador com software HPchem e biblioteca WILEY de espectros de massa.

A coluna utilizada foi uma DB-23 30m x 0,25µm x 0,25mm da Agilent Technologies com fase estacionária 50% cianopropil-metil polisiloxana.

4.3. Métodos Experimentais

Para a realização do presente trabalho foram analisadas seis amostras, sendo elas:

- Cobertura de Chocolate Esquimó (Amostra 1);
- Cobertura de Chocolate Branco Esquimó (Amostra 2);
- Gordura de Soja Parcialmente Hidrogenada (Amostra 3);
- Gordura Vegetal Hidrogenada (Amostra 4);
- Óleo de Palma (Amostra 5);
- Óleo de Soja (Amostra 6).

4.3.1. Solução de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{H}_2\text{SO}_4$ em metanol

Adicionou-se lentamente em um balão de destilação de 1L 16g de NH_4Cl , 480mL de metanol e 24mL de H_2SO_4 conc. O sistema foi levado então a refluxo por 15min, deixado esfriar, sendo transferido para um frasco de vidro e armazenado em geladeira.

4.3.2. Extração dos Lipídeos

Com o objetivo de determinar a necessidade de uma extração lipídica preliminar a preparação dos ésteres metílicos nas amostras de chocolate e chocolate branco foi realizada a extração dos lipídeos, baseando-se no método de Folch et al.²² Os lipídeos extraídos foram então esterificados e analisados, comparando os resultados obtidos com o das amostras sem extração lipídica.

Para a extração, pesou-se 1g de amostra em um becher de 50mL, onde foram adicionados 5mL de metanol e homogeneizado sob agitação vigorosa por 5min em agitador magnético.

Após esta etapa, foram adicionados 10mL de clorofórmio, agitando a mistura por 5min e levando ao ultrasom por mais 5min. A mistura foi então transferida para um tubo de ensaio e centrifugada por 10min à 3.500rpm, sendo o líquido reservado e o sólido ressuspendido em 6mL de uma solução clorofórmio/metanol (2:1 v/v) e homogeneizada por 5min. Posteriormente a mesma foi filtrada por gravidade em papel filtro pregueado e lavada com 10mL de clorofórmio e 5mL de metanol.

As fases líquidas foram combinadas, transferidas para um funil de separação, onde foi adicionada a mesma $\frac{1}{4}$ do seu volume de uma solução de NaCl 0,88%. A mistura foi agitada, levada a repouso e a fase de clorofórmio, contendo os lipídios, transferida para um becher de 100mL, sendo seca com Na_2SO_4 anidro e filtrada em papel filtro pregueado.

O volume total da fase lipídica foi anotado e uma fração transferida para um balão de destilação de 100mL de modo a ser concentrada para esterificação.

4.3.3. Preparação dos Ésteres Metílicos

A preparação dos ésteres metílicos foi realizada, baseando-se no método desenvolvido por Hartman & Lago.²³

Para óleos, foram pesados entre 0,4 e 0,5g de amostra, enquanto que para gorduras valores entre 0,2 e 0,3g. As amostras foram pesadas diretamente em um balão de destilação de 100mL, sendo adicionados 5mL de KOH alcoólico 0,5 mol.L⁻¹ (**Reagente 1**).

O sistema foi levado a refluxo por 5min e então adicionado ao balão ainda quente 15mL de NH₄Cl/H₂SO₄ em metanol (**Reagente 2**), refluxando por mais 5min. Deixou-se a solução esfriar e então adicionou-se 10mL de heptano ao balão, transferindo a mistura para um funil de separação de 60mL, agitando o mesmo por aproximadamente 15s.

Deixou-se separar as fases, sendo a fase de heptano separada, seca com Na₂SO₄ anidro e filtrada em papel filtro pregueado. A amostra foi então concentrada com nitrogênio, ressuspensa em 2mL de heptano e analisada.

4.3.4. Condições Cromatográficas

As análises foram realizadas por CG/MS, no equipamento mencionado anteriormente, utilizando uma temperatura de 250°C para o injetor, com um sistema isotérmico de 175°C, para a coluna, por 30min, Hélio como gás de arraste com fluxo de 0,4mL.min⁻¹ e Split de 250:1 para todas as amostras, com a exceção da Amostra 3 onde se fez necessário o uso de um Split de 400:1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo a resolução RDC nº 360 da ANVISA, passou a ser obrigatório a partir do dia 31 de julho de 2006 a presença do teor de gorduras trans no rótulo dos alimentos comercializados no país. Mediante essa imposição legislativa, decorrente dos indícios de que essas substâncias podem ser nocivas ao organismo, podendo provocar o aumento do risco de doenças coronárias, alguns setores da indústria de alimentos passaram a investir em tecnologia para a determinação desses componentes. Assim, o trabalho desenvolvido em parceria com o laboratório de cromatografia da empresa Duas Rodas Industrial é parte deste projeto.

A metodologia oficial, recomendada pela AOCS²⁴, faz utilização da técnica de cromatografia gasosa, com detector de ionização em chama (FID) e padrões com certificado de referência, de modo a comparar os tempos de retenção dos padrões com o das amostras analisadas, bem como a utilizar o método de calibração externa para a quantificação dos componentes.

Tendo conhecimento das dificuldades de se obter padrões necessários, em tempo hábil, para a determinação de ácidos graxos trans, foi empregado um método alternativo ao uso de padrões de modo a se avaliar, em primeiro momento, os resultados obtidos com os constantes nas fichas técnicas dos produtos analisados e futuramente, com a aquisição de padrões, comparar estes resultados com os utilizados na metodologia oficial da AOCS.

Para o desenvolvimento do método alternativo proposto neste trabalho, foram utilizadas seis amostras, sendo uma de chocolate, outra de chocolate branco, gordura de soja parcialmente hidrogenada, gordura vegetal hidrogenada, gordura de palma e óleo de soja.

5.1. Derivatização das Amostras

As amostras foram submetidas a uma reação de hidrólise, seguida de uma esterificação, gerando ésteres metílicos de ácidos graxos, os quais foram analisados por CG/MS, sendo utilizados os valores de porcentagem de área referentes aos picos cromatográficos e o teor de lipídeos totais das amostras como base de cálculo para a determinação do teor de gorduras saturadas,

mono e poliinsaturadas e de gorduras trans. As análises do teor de lipídeos totais foram realizadas pelo laboratório de análises físico-químicas da empresa Duas Rodas Industrial, sendo os resultados apenas aplicados para os cálculos necessários.

A determinação de ácidos graxos trans por cromatografia gasosa é uma análise já utilizada há algum tempo em diversas áreas da ciência. Sabe-se que os ácidos graxos de cadeia curta podem ser injetados diretamente no cromatógrafo, porém os ácidos graxos de cadeia longa não são suficientemente voláteis para a análise direta, necessitando serem derivatizados na forma de ésteres metílicos. Desse modo, deve-se evitar duas fontes de erro nessa derivatização: a conversão incompleta dos ácidos graxos (ligados ou livres) aos ésteres desejados e a alteração da estrutura durante a liberação e esterificação dos ácidos graxos.

Existem vários métodos para a preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos. O procedimento apresentado neste trabalho está baseado no método proposto por Hartman & Lago²³, que utiliza reagentes comuns como cloreto de amônio, ácido sulfúrico, hidróxido de potássio e metanol.

Inicialmente foram preparados os reagentes, em quantidade suficiente para a realização de todo o procedimento experimental, de modo a excluir possíveis erros referentes à diferença de soluções. As reações de esterificação foram ainda realizadas num período de cinco dias, sendo os reagentes conservados em geladeira durante esse tempo. Isso se fez necessário para evitar erros nos resultados causados por diferença de concentração da solução de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{H}_2\text{SO}_4$ alcoólica, uma vez que a combinação desses reagentes no preparo da solução gera HCl in situ, conforme mostrado na **Figura 9**, que pode evaporar com o tempo.

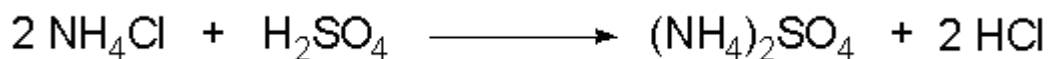


Figura 9. Reação com formação de HCl em metanol.

Este reagente é importante, uma vez que a reação de esterificação é comprometida na presença de água e que o ácido sulfúrico é um ácido muito

forte, podendo atacar as duplas ligações dos ácidos graxos insaturados, comprometendo o resultado das análises. Sendo assim, a reação gera HCl in situ, livre da presença de água e em concentrações adequadas à reação, evitando a conversão incompleta dos ácidos graxos, bem como a alteração da estrutura dos mesmos.

Tendo feito os reagentes necessários, iniciou-se o processo de esterificação das amostras onde uma dada massa foi adicionada a um balão de destilação juntamente com o **Reagente 1** e mantida sob refluxo. Essa reação, induzida por base, converte os triacilgliceróis presentes nas amostras nos respectivos ácidos e glicerol.

O mecanismo da reação, conforme mostrado na **Figura 10**, passa pela adição nucleofílica de um hidróxido ao grupo carboxila de um dos ésteres do triacilgliceról dando origem a um alcóxido tetraédrico. Em seguida, a eliminação do íon alcóxido dá origem ao ácido carboxílico correspondente, contudo, pelo fato do íon alcóxido ser mais deficiente em elétrons, ele abstrai o próton do ácido carboxílico, originando um íon carboxílico, que permanecerá em solução na forma de sal (RCOO^-K^+) por não existir uma fonte protônica suficiente, disponível no meio.

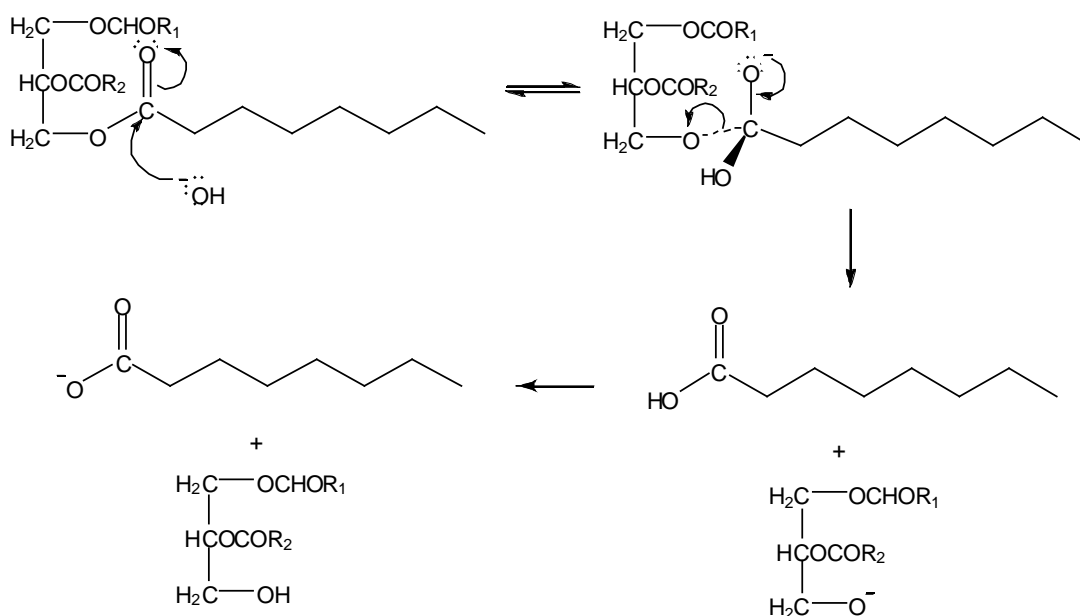


Figura 10. Mecanismo de clivagem com íon hidróxido.

No decorrer da reação, foi adicionado o **Reagente 2** em uma quantidade suficiente para promover a protonação do íon carboxílico e ainda atuar como catalisador da esterificação dos ácidos graxos, seguindo a reação de Fischer.

O mecanismo desta reação (**Figura 11**) passa por uma catálise ácida, uma vez que os ácidos carboxílicos não são reativos o suficiente para reagir em meio neutro. O ácido protona o átomo de oxigênio do grupo carbonila, tornando a molécula do ácido carboxílico possivelmente carregada, ativando-a para o ataque nucleofílico pela molécula de metanol, dando origem a um intermediário tetraédrico. A partir daí, a transferência de um próton de um oxigênio para outro origina um segundo intermediário tetraédrico e converte o grupo OH em um bom grupo de saída. Finalmente a perda de um próton regenera o catalisador ácido, originando o éster metílico do ácido graxo (FAME) correspondente.

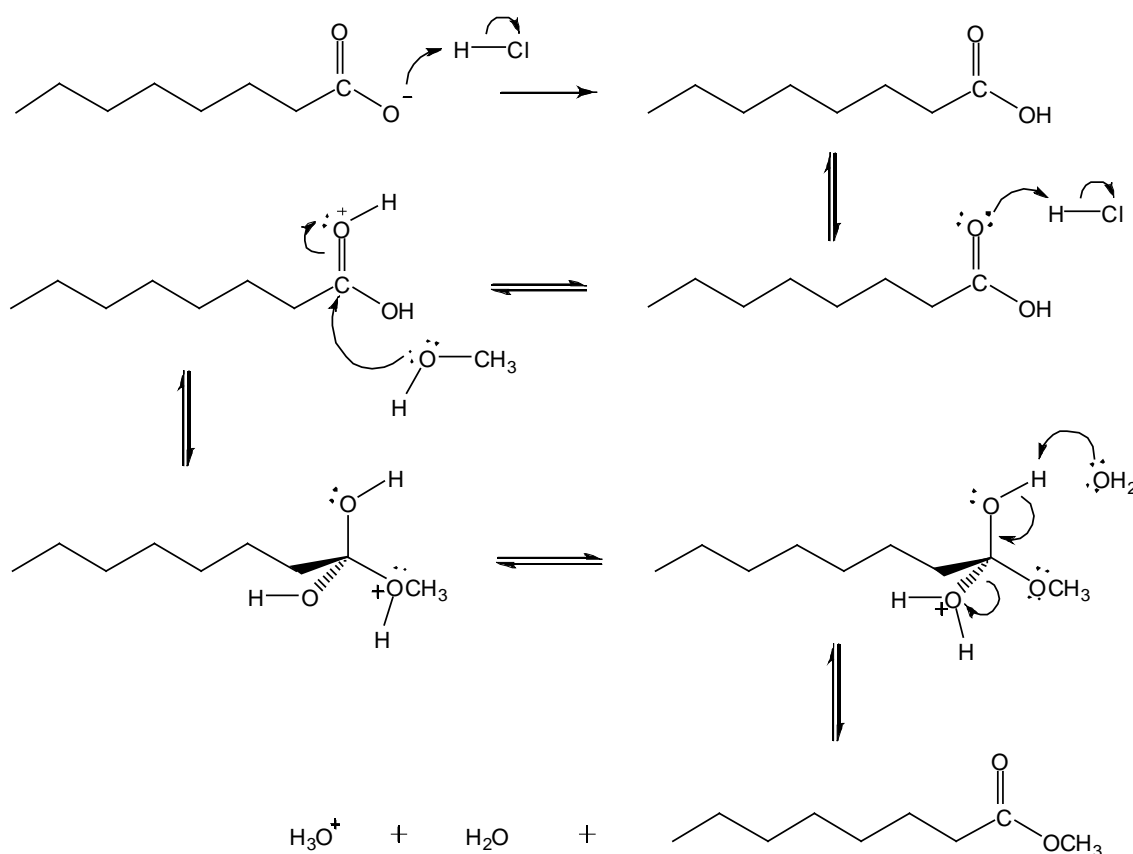


Figura 11. Mecanismo da reação de esterificação de Fischer.

Por fim as misturas reacionais foram extraídas com heptano e secas com sulfato de sódio para retirar qualquer traço de água presente no meio e que pudesse iniciar o processo reverso, de formação dos ácidos graxos, uma vez que toda a reação é reversível, ocorrendo através de deslocamento de equilíbrios.

5.2. Determinação do Perfil Lipídico

As soluções já avolumadas contendo os ésteres metílicos dos ácidos graxos (FAME) foram então analisadas por CG/MS, utilizando sistema de injeção manual em triplicata para cada amostra. As amostras foram analisadas utilizando as condições experimentais descritas no procedimento. Todas as amostras foram analisadas utilizando um sistema de divisão de fluxo (Split) de 250:1, com a exceção da Amostra 3, a qual foi analisada com Split de 400:1. Este procedimento se fez necessário pois a amostra possuía um elevado teor de ácidos graxos trans (C18:1 t) que provocava a coeluição dos picos do respectivo FAME com o do ácido C18:1 9c. Os cromatogramas obtidos foram integrados e analisados, obtendo assim os tempos de retenção dos picos cromatográficos. O cromatograma característico de uma amostra de chocolate (Amostra 2) pode ser observado no ANEXO 1.

A identificação dos picos cromatográficos foi feita utilizando a biblioteca de massas WILEY, dados teóricos de ponto de fusão dos compostos e ordem de eluição esperada para os FAMES em uma coluna DB-23 de 60m. Inicialmente foram identificados, com o auxílio dos espectros de massa, os FAMES saturados, bem como alguns compostos com eluição bem definida, como é o caso dos FAMES do C14:1, C16:1, C18:1 9c e C20:1 c. Também pode ser identificado via espectro de massa, quais picos correspondiam aos ésteres metílicos mono, di e triinsaturados. Com esses dados, tendo a ordem de eluição esperada para uma coluna análoga e sabendo que de acordo com o ponto de fusão, os FAMES trans eluem antes dos respectivos cis, obteve-se a caracterização dos picos cromatográficos apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Caracterização dos picos cromatográficos.

TR	Composto Correspondente	Ácido Graxo Equivalente	
2,494	octanoato de metila	C8:0	Ácido Caprílico
2,844	decanoato de metila	C10:0	Ácido Cáprico
3,536	dodecanoato de metila	C12:0	Ácido Láurico
4,883	tetradecanoato de metila	C14:0	Ácido Mirístico
5,989	tetradecenoato de metila	C14:1	Ácido Miristoléico
7,615	hexadecanoato de metila	C16:0	Ácido Palmítico
8,210	hexadecenoato de metila	C16:1	Ácido Palmitoléico
9,715	heptadecanoato de metila	C17:0	Ácido Margárico
12,818	octadecanoato de metila	C18:0	Ácido Esteárico
13,405	trans-octadecenoato de metila	C18:1 t	Ácido Elaídico
13,812	9-cis-octadecenoato de metila	C18:1 c	Ácido Oléico
14,110	cis-octadecenoato de metila	C18:1 c	
14,342		C18:1 c	
14,596		C18:1 c	
14,882	trans-octadienoato de metila	C18:2 t	Ácido Linolaídico
15,147		C18:2 t	
15,418	9,12-cis-octadienoato de metila	C18:2 c	Ácido Linoléico
15,864	cis-octadienoato de metila	C18:2 c	
16,432		C18:2 c	
17,923	cis-octadecatrienoato de metila	C18:3 c	Ácido Linolênico
19,045	9,12,15-cis-octadecatrienoato de metila	C18:3 c	
20,954	cis-octadecatrienoato de metila	C18:3 c	
21,769		C18:3 c	
22,812	eicosanoato de metila	C20:0	Ácido Araquídico
24,545	cis-eicosenoato de metila	C20:1 c	Ácido Gadoléico

5.3. Efeito da Matriz

Para a avaliação da necessidade de se fazer uma extração preliminar dos lipídeos das Amostras 1 e 2 com o objetivo de verificar a influência das

matrizes mais complexas no processo de preparação dos ésteres metílicos, foram preparadas soluções de FAME a partir das amostras brutas (Amostra 1A e 2A) e dos lipídeos pré-extraídos (Amostra 1B e 2B) pelo método mencionado, baseado no de Folch et al²², as quais foram analisadas, sendo os resultados expressos em termos de porcentagem de área, conforme mostrado na **Tabela 6**, juntamente com os valores de desvio-padrão.

Tabela 6. Resultados da extração lipídica das amostras de chocolate em porcentagem de área e desvio-padrão das análises em triplicata.

Ácido Graxo	Amostra 1A	Amostra 1B	Amostra 2A	Amostra 2B
C8:0	0,394 ± 0,043	0,379 ± 0,010	0,335 ± 0,010	0,354 ± 0,012
C10:0	0,548 ± 0,047	0,533 ± 0,001	0,573 ± 0,014	0,508 ± 0,033
C12:0	10,458 ± 0,029	10,363 ± 0,006	10,596 ± 0,112	10,072 ± 0,336
C14:0	4,005 ± 0,017	3,987 ± 0,012	4,035 ± 0,490	3,917 ± 0,056
C14:1	0,008 ± 0,004	0,006 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,008 ± 0,001
C16:0	13,144 ± 0,050	13,16 ± 0,046	12,236 ± 0,100	12,275 ± 0,111
C16:1	0,020 ± 0,002	0,016 ± 0,006	0,017 ± 0,003	0,016 ± 0,003
C17:0	0,036 ± 0,005	0,033 ± 0,004	0,040 ± 0,008	0,038 ± 0,001
C18:0	9,353 ± 0,042	9,447 ± 0,036	9,631 ± 0,032	9,824 ± 0,111
C18:1 t	20,767 ± 0,041	20,904 ± 0,111	20,290 ± 0,274	20,738 ± 0,238
C18:1 c	29,877 ± 0,044	29,835 ± 0,136	29,578 ± 0,312	30,019 ± 0,169
C18:1 c	2,131 ± 0,075	2,195 ± 0,063	2,298 ± 0,031	2,286 ± 0,039
C18:1 c	5,279 ± 0,040	5,299 ± 0,017	5,365 ± 0,022	5,362 ± 0,008
C18:1 c	0,465 ± 0,023	0,450 ± 0,001	0,500 ± 0,020	0,432 ± 0,045
C18:2 t	1,180 ± 0,044	1,130 ± 0,009	1,313 ± 0,038	1,218 ± 0,078
C18:2 t	0,155 ± 0,011	0,133 ± 0,004	0,213 ± 0,018	0,163 ± 0,032
C18:2 c	0,211 ± 0,027	0,174 ± 0,026	0,282 ± 0,027	0,223 ± 0,038
C18:2 c	1,683 ± 0,066	1,688 ± 0,071	2,295 ± 0,060	2,186 ± 0,041
C18:2 c	0,108 ± 0,021	0,099 ± 0,023	0,165 ± 0,007	0,144 ± 0,007
C20:0	0,178 ± 0,017	0,169 ± 0,025	0,229 ± 0,013	0,217 ± 0,012

Analisando os dados apresentados na **Tabela 6** verificamos que se for levado em conta os resultados obtidos juntamente com os desvios padrões em cada amostra, não será encontrada diferença significativa entre os valores.

Também, de acordo com a AOAC²⁵, a diferença aceitável entre resultados para os ácidos graxos principais (> 5%) obtidos no mesmo dia, pelo mesmo operador e com uma mesma amostra, não deve diferir por mais de 3% relativo, diferença esta não encontrada nos resultados obtidos.

Portanto pode-se concluir que as matrizes das duas amostras analisadas não causam interferência significativa sobre o processo de formação dos ésteres metílicos.

5.4. Quantificação das Amostras

Com esses dados em mãos e com os picos cromatográficos já identificados, foi determinada a porcentagem de área relativa ao FAME dos ácidos graxos, sendo os valores médios expostos na **Tabela 7**.

Tabela 7. Valores de porcentagem de área dos ésteres metílicos correspondentes aos ácidos graxos.

Ác. Graxo	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6
C8:0	0,394	0,335	-	1,538	-	-
C10:0	0,548	0,573	-	2,210	0,011	-
C12:0	10,458	10,596	0,046	28,666	0,247	-
C14:0	4,005	4,035	0,085	14,922	0,874	0,049
C14:1	0,008	0,009	0,004	0,012	0,027	0,005
C16:0	13,144	12,236	13,898	13,846	43,142	13,410
C16:1	0,020	0,017	0,022	-	0,065	0,029
C17:0	0,036	0,040	0,042	0,034	0,063	0,053
C18:0	9,353	9,631	10,341	37,726	5,49	4,572
C18:1 t	20,767	20,290	25,465	-	-	-
C18:1 c	29,877	29,578	32,390	0,494	41,294	25,866
C18:1 c	2,131	2,298	2,867	-	0,676	1,472

Tabela 7. Continuação.

Ác. Graxo	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6
C18:1 c	5,279	5,365	7,288	-	-	-
C18:1 c	0,465	0,500	0,452	-	-	0,014
C18:2 t	1,180	1,313	1,544	-	-	-
C18:2 t	0,155	0,213	0,140	-	-	-
C18:2 c	0,211	0,282	0,305	-	0,044	0,169
C18:2 c	1,683	2,295	4,613	0,379	7,729	49,398
C18:2 c	0,108	0,165	0,271	-	-	-
C18:3 c	-	-	-	-	-	0,291
C18:3 c	-	-	-	-	0,050	4,293
C18:3 c	-	-	-	-	-	0,019
C18:3 c	-	-	-	-	-	0,015
C20:0	0,178	0,229	0,227	0,173	0,262	0,284
C20:1 c	-	-	-	-	0,026	0,061
$\Sigma\%$ Sat	38,116	37,675	24,639	99,115	50,089	18,368
$\Sigma\%$ Mono	37,780	37,767	43,023	0,506	42,088	27,447
$\Sigma\%$ Poli	2,002	2,742	5,189	0,379	7,823	54,185
$\Sigma\%$ Trans	22,102	21,816	27,149	0,000	0,000	0,000

Verificando os resultados apresentados, pode-se observar uma semelhança muito grande entre os resultados obtidos para as Amostras 1 e 2 (amostras de chocolate) indicando que as mesmas devem possuir um processo semelhante de produção, apresentando um elevado teor de ácidos graxos trans. Também pode-se observar que a amostra que apresentou o valor mais alto de gorduras trans foi a Amostra 3 (gordura de soja parcialmente hidrogenada), indicando um processo de hidrogenação parcial, com uma provável seletividade de reação alta, possibilitando a formação elevada de isômeros trans. Já ao contrário, a amostra de gordura vegetal hidrogenada (Amostra 4) não apresentou teor de gorduras trans, possuindo aproximadamente 99% do seu valor relativo de ácidos graxos saturados,

indicando um processo de fabricação com baixíssima seletividade, sem a formação de isômeros trans.

Outra verificação é de que as Amostras 1, 2, 3 e 4 não apresentaram, pelo menos em níveis detectáveis, gorduras triinsaturadas, muito provavelmente devido ao fato de esses ácidos serem os mais reativos, sendo facilmente hidrogenados.

Com relação aos resultados obtidos para o óleo de soja e a gordura de palma, encontramos semelhanças no fato de que ambas não apresentam ácidos graxos trans em sua composição. O óleo de soja apresentou uma porcentagem relativa de aproximadamente 81,5% de ácidos graxos insaturados, conferindo a ele um caráter líquido a temperatura ambiente. Já a gordura de palma, por apresentar um valor aproximado de 50% de saturados e 50% de insaturados acaba apresentando uma consistência semi-sólida a temperatura ambiente.

Ainda com relação à presença de isômeros trans, em primeiro momento, seria de se esperar que a gordura de palma apresentasse essas substâncias em sua composição. Porém isso não ocorre porque a gordura de palma não passa por nenhum processo de hidrogenação. Na verdade, trata-se de um tipo de gordura natural, retirada da polpa da palma e que apresenta uma consistência semi-sólida por possuir uma relação aproximada de 50% de ácidos graxos saturados e 50% de ácidos graxos insaturados. Sendo então uma gordura natural, explica-se o fato de não apresentar ácidos graxos trans.

Com os resultados da análise de lipídeos totais, foram feitas as conversões de porcentagem de área para valores mássicos, conforme mostrado na **Tabela 8**. Este cálculo foi feito considerando-se que o valor de gorduras totais de cada amostra correspondia a 100% da área dos cromatogramas, sendo os percentuais de gorduras saturados, insaturadas e trans convertidos à valores mássicos por simples correlação.

Um fato interessante a ser observado nessa tabela é que ela mostra a grande quantidade de gorduras saturadas e trans apresentadas pelas Amostras 1 e 2, bem como o valor total de gorduras das mesmas (aproximadamente 50%). Esses valores são considerados extremamente altos, já que se tratam de amostras de chocolate e que tem como destino o consumidor, não sendo mais diminuída a proporção de gorduras.

Tabela 8. Resultados obtidos em gramas por 100 gramas de amostras analisadas.

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6
G.Total	52,72	53,23	80,80	94,31	100,00	84,27
Sat	20,09	20,05	19,91	93,47	50,09	15,48
Mono	19,92	30,90	55,34	0,48	42,09	23,13
Poli	1,06	1,46	5,55	0,36	7,82	45,71
Trans	11,65	11,61	21,94	0,00	0,00	0,00

Após a apresentação da **Tabela 8**, onde é mostrado o valor de gorduras totais, é importante fazer uma observação referente ao método de análise utilizado neste trabalho. Como sabemos, os lipídeos não são constituídos exclusivamente por óleos e gorduras, podendo apresentar outros componentes, com esteróides, terpenos, prostaglandinas, fosfolipídeos em sua composição. Sendo assim, os resultados obtidos pelo método apresentado só podem ser considerados representativos para amostras que contenham essencialmente glicerídicas em sua composição pois o cálculo de porcentagem de área é feito considerando que a fração lipídica é composta apenas por glicídios e ácidos graxos livres. Contudo, como a indústria de alimentos utiliza em grande escala óleos e gorduras vegetais hidrogenadas, o método pode apresentar grande aplicação.

Das amostras analisadas, uma apresentava um valor de referência, que pode ser utilizado para uma comparação preliminar do método usado. A amostra de chocolate possuía um relatório de análise emitido por um laboratório externo que utiliza a metodologia oficial da AOCS, sendo a comparação feita em valores percentuais (**Tabela 9**).

Comparando os resultados apresentados, observa-se que os resultados, para gorduras trans são muito semelhante, divergindo em apenas 1,086%, ficando abaixo dos 3% relativos aceitos pela AOAC.

Tabela 9. Comparação de resultados da amostra de chocolate.

	Relatório Externo	Experimental
$\Sigma\%$ Sat	38,003	38,116
$\Sigma\%$ Mono	38,354	37,780
$\Sigma\%$ Poli	2,627	2,002
$\Sigma\%$ Trans	21,016	22,102

5.5. Comparação entre Óleos e Gorduras

Com a sobreposição dos cromatogramas das amostras de óleo de soja e gordura de soja parcialmente hidrogenada (ANEXO 2) pode-se ter uma melhor visualização do que acontece durante o processo de hidrogenação de óleos. Devido à presença de um processo predominantemente seletivo existirão períodos relativamente longos de adsorção e dessorção das moléculas insaturadas antes que elas reajam, havendo um aumento na oportunidade de os radicais mais reativos deslocarem os que são menos reativos e menos adsorvidos. Nesse caso, os ácidos tri, seguidos dos diinsaturados são os componentes mais reativos. Isso pode ser observado nos cromatogramas sobrepostos, onde ocorre o desaparecimento de todos os ácidos triinsaturados, em 17,94min e 19,04min, quase todos os diinsaturados em 16,15min e pouco monoinsaturados, originando alguns ácidos de cadeia saturada (12,82min) e em quantidades mais intensas a formação de isômeros geométricos trans de 13,15-13,678min e 14,75-15,28min, e de posição monoinsaturados (14,10-14,75min) e diinsaturados (15,86min).

Fato inverso é observado na amostra de gordura vegetal hidrogenada (Amostra 4), onde devido a um processo pouco seletivo, existe a conversão quase que completa dos ácidos graxos insaturados em saturados, fazendo a porcentagem relativa de saturados na amostra chegar a aproximadamente 99%.

O que ocorre durante o processo de adsorção de uma dupla ligação na superfície do metal ativo provocando a saturação ou a isomerização irá depender da concentração de hidrogênio na superfície do catalisador e do tipo de catalisador usado. Esse processo pode ser melhor entendido, analisando a

Figura 12, onde o ácido graxo contendo uma dupla ligação cis entre os átomos C9 e C10 interage com a superfície do catalisador. Uma espécie atômica H* adsorvida nas vizinhanças da dupla ligação pode ligar-se ao carbono C9, gerando o intermediário hemi-hidrogenado. A partir desse estado podem ser propostos vários mecanismos:⁸

- 1) O mesmo átomo H* sai do C9 antes que C10 possa adquirir outro H*, e nesse caso a dupla original é refeita sem mudança;
- 2) O outro H* do C9 é perdido, formando novamente uma dupla ligação, de configuração trans (isômero geométrico);
- 3) Um átomo de H* é perdido pelo C11, formando uma dupla ligação cis entre os carbonos 10 e 11 (isômero posicional);
- 4) Um átomo de H* é perdido pelo C11, formando uma dupla ligação trans entre os carbonos 10 e 11 (isômero geométrico e posicional);
- 5) C10 captura um H*, a dupla ligação é então saturada e desorvida.

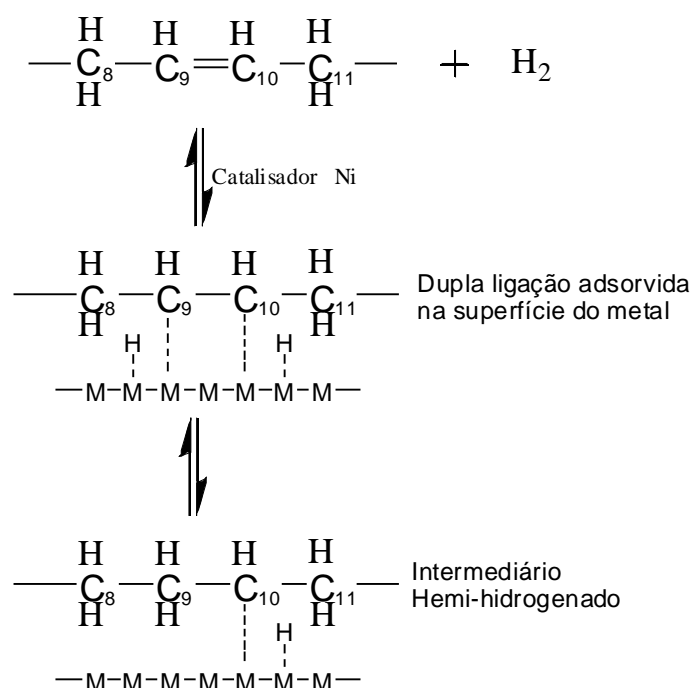


Figura 12. Adsorção de uma dupla ligação aos átomos do catalisador.

Em conseqüência do processo de hidrogenação, portanto, podem existir dois tipos de gorduras: uma formada quase que exclusivamente por gorduras

saturadas e outra contendo uma grande quantidade de isômeros trans, ambos nocivos à saúde, podendo gerar os problemas já mencionados.

Uma solução para esse problema seria a substituição das gorduras tradicionalmente utilizadas na indústria de alimentos pela gordura de palma, que como já mencionado, trata-se de uma gordura natural, que apresenta a consistência necessária às gorduras, porém não apresenta em sua composição ácidos graxos trans, contendo ainda um valor não muito alto de gorduras saturadas, tornando-se assim uma fonte alternativa para a indústria.

6. CONCLUSÃO

A proposta desse trabalho foi utilizar um método para a determinação de ácidos graxos trans em amostras que apresentavam frações de lipídeos basicamente glicerídica, sem a utilização de padrões.

Foi inicialmente testada a influência da matriz de duas amostras, por se julgar que estas poderiam influenciar no processo de metilação das amostras, concluindo que as mesmas não causaram alterações significativas durante o processo, estando os resultados obtidos dentro dos 3% relativos de variação aceitos pela AOAC.

O uso da técnica de CG/MS, juntamente com o auxílio de dados teóricos, tornou possível a identificação dos componentes presentes em cada amostra, possibilitando a quantificação relativa a cada ácido graxo. Utilizando os valores obtidos de porcentagem de área, juntamente com o teor de lipídeos totais obteve-se então os valores absolutos para cada amostra, não sendo encontrado teores de gorduras trans no óleo de soja, gordura de palma e gordura vegetal hidrogenada. Já a gordura de soja parcialmente hidrogenada, o chocolate branco e chocolate apresentaram valores de 21,94, 11,61 e 11,65 gramas por cem gramas de amostra, respectivamente.

Quando comparados os valores obtidos para a amostra de chocolate com os de uma análise externa, que utilizava a metodologia oficial da AOCS, constatou-se que a técnica empregada neste trabalho apresentou resultados muito semelhantes aos da análise externa, havendo uma diferença relativa de 1,1% para ácidos graxos trans. Esse resultado pode ser interpretado como sendo um bom indício da precisão do método, contudo essa afirmação só pode ser feita mediante estudos mais aprofundados, com a utilização de padrões, comparando a metodologia oficial com a aplicada sob as mesmas condições de análise, devendo ainda ser feitas mais avaliações interlaboratoriais.

Com relação à avaliação sobre o processo de hidrogenação constata-se que a reação acaba sendo induzida ou à formação de isômeros trans ou à saturação completa dos ácidos graxos, não sendo nenhuma das duas alternativas benéfica às necessidades nutricionais, sendo a gordura de palma uma alternativa para a redução de ambas as substâncias nos alimentos industrializados.

7. PERSPECTIVAS

Dando continuidade a este projeto, após a aquisição de padrões, será feita a confirmação da identidade dos picos cromatográficos apresentados.

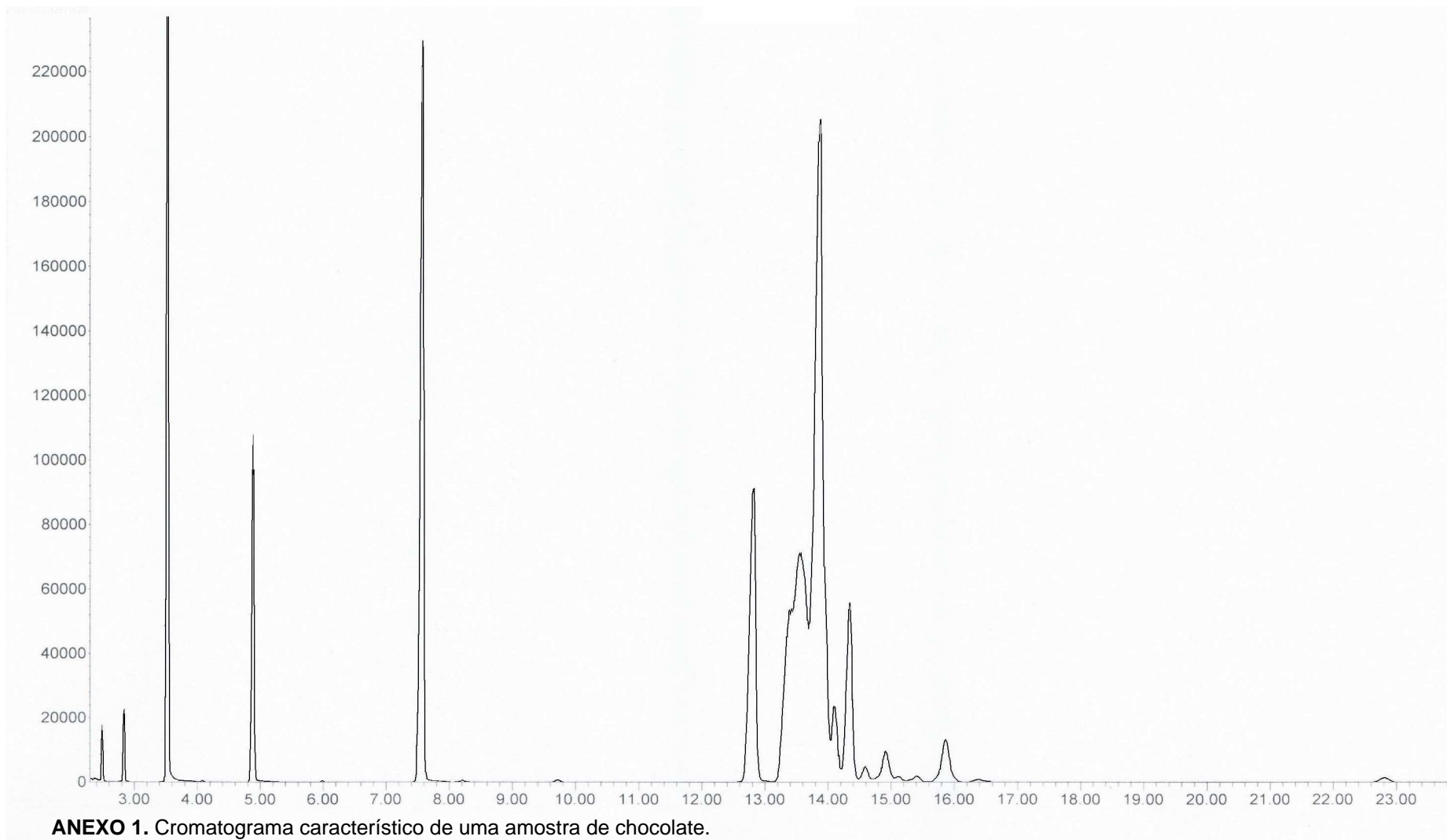
Também será feita a validação da metodologia da AOCS, mencionada no trabalho, seguida das análises das mesmas amostras aqui utilizadas, podendo ser feita uma comparação mais aprofundada do método empregado no trabalho e dos resultados obtidos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. PEREIRA, A., Duas Rodas Especial 80 anos: 80 anos, o sabor da missão cumprida e dos desafios que estão por vir, Mix Duas Rodas História, n.12, dezembro de 2005.
2. CANUTO et al., A essência da nossa história, Jaraguá do Sul, 2003.
3. Kit imprensa 2005, Duas Rodas Industrial, 2005.
4. MCMURRY, J.; Química Orgânica, 4ª ed., Vol. 2, Cap. 21 e 28, , LTC, Rio de Janeiro, 1997.
5. WEISS, T.J., Food oils and their user, 2ª ed. Chichester, Avi, 1983.
6. LEHNIGER, A.L. - Princípios de Bioquímica, Savier, SP, 1998.
7. NUNES, I.J. Nutrição animal básica. 2. ed. Ver. Aum. Belo Horizonte: FEP –MVZ Editora, 1998. 388 p.
8. BLOCK, J.M., Comportamento térmico de gorduras técnicas produzidas no Brasil, Dissertação de Mestrado, UFSC, março de 1992.
9. ELIAS S.L, INNIS, S.M. Bakery foods are the major dietary source of *trans*-fatty acids among pregnant women with diets providing 30 percent energy from fat. J. Am. Diet. Assoc.,102:46–51, 2002.
10. SABARENSE, C.M., Avaliação do efeito dos ácidos graxos trans sobre o perfil dos lipídios teciduais de ratos que consumiram diferentes teores de ácidos graxos essenciais, Tese de doutorado, USP, junho de 2003.
11. AUED-PIMENTEL, S. et al. Ácidos graxos saturados *versus* ácidos graxos *trans* em biscoitos. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 62(2): 131 - 137, 2003.
12. LARQUE, E.; ZAMORA, S.; Gil, A. Dietary *trans* fatty acids in early life: a review. Early Human Development, 65: S31-S41, 2001.
13. LOI, C.; CHARDIGNY, J.-M; ALMANZA, S.; LECLERE, L.; GINIES, C.; SÉBÉDIO, J.-L. Incorporation and metabolism of dietary trans isomers of linolenic acid alter the fatty acid profile of rat tissues. J. Nutr., Bethesda, v.130, p.2550-2555, 2000.
14. WUST, E., Estudo da viabilidade técnico-científica da produção de biodiesel a partir de resíduos gordurosos, Dissertação de Mestrado, FURB, 2004.
15. FORMO, Marvin W. et al, Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 4. ed . New York: Wiley Interscience Publication, Vol. I, p . 192 –196, 1979.

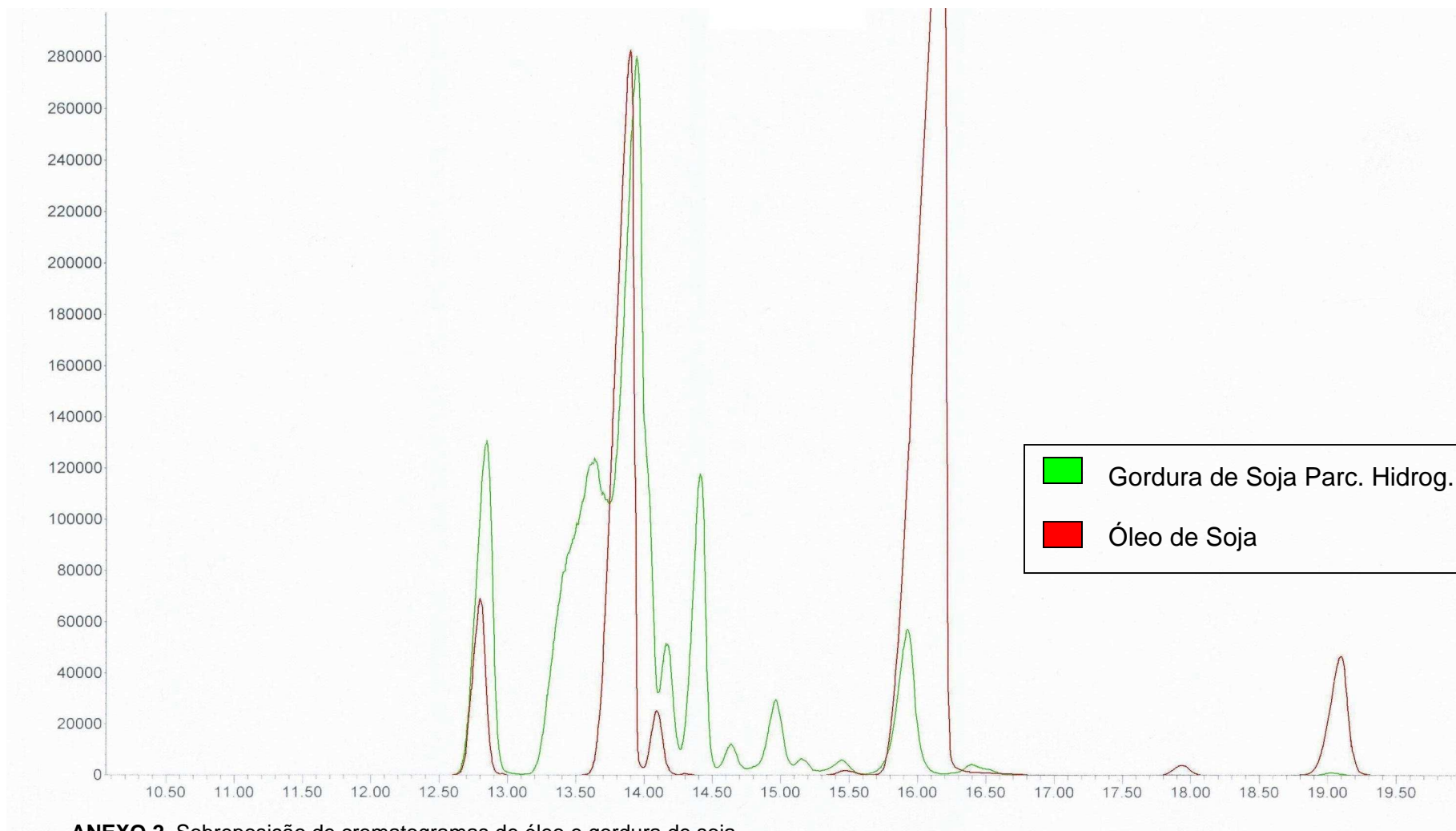
16. BENCKE, S.G., Moldagem e simulação do processo de hidrogenação de óleo de soja em um reator de recirculação (tipo loop), Tese de Doutorado, UNICAMP, 2004.
17. O'BRIEN, R. D. Fats and oils: formulation and Processing for applications. USA: Technomic Publishing Company, 1998. 667 p.
18. SOLOMONS, G.; Química Orgânica, 7ª ed., Vol. 1, Cap. 7 p.261, LTC, Rio de Janeiro, 2001.
19. Brasil, Leis, Decretos, etc. Lei nº 8.078, 11 de setembro de 1990. Diário Oficial, Brasília, 12 set, 1990. Seção I (supl.). p. 1-12.
20. http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/360_03rdc.htm acessado em 02 de julho de 2006.
21. Brasil, Leis, Decretos, etc. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico para Informação Nutricional Complementar, 1998.
22. FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. Journal of Biological Chemistry, v. 226. n.1, p.497-509, 1957.
23. HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparations of fatty acid methyl esters from lipids. Laboratory Practice, v. 22, n. 8, p. 475-476, 1973.
24. AOCS – Official Method Ce 1f-96, American Oil Chemists Society, 1997.
25. AOAC – Official methods of analysis, 15th ed., p.964-965. Association of Official Analytical Chemists, 1990.

9. ANEXO



ANEXO 1. Cromatograma característico de uma amostra de chocolate.

Condições cromatográficas: Coluna DB-23 30m x 0,25 μ m x 0,25mm; T_{col} = isoterma de 175°C por 30 min; T_{inj} = 250°C; V_{inj} = 1 μ L; Split 250:1; Gás de arraste: Hélio a 0,4mL.min⁻¹;



ANEXO 2. Sobreposição de cromatogramas de óleo e gordura de soja.

Condições cromatográficas: Coluna DB-23 30m x 0,25 μ m x 0,25mm; T_{col} = isoterma de 175°C por 30 min; T_{inj} = 250°C; V_{inj} = 1 μ L; Split 250:1; Gás de arraste: Hélio a 0,4mL.min⁻¹;